

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/40, 15/54, 5/10 A01H 5/00</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/11517 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: EP 513054 8. August 1991 (08.08.91)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP91/00130</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 24. Januar 1991 (24.01.91)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 40 03 045.8 2. Februar 1990 (02.02.90) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SCHNEIDER, Rudolf [DE/DE]; Feldbergstrasse 98, D-6233 Kelkheim (DE). DONN, Günter [DE/DE]; Sachsenring 35, D-6238 Hofheim am Taunus (DE). MÜLLNER, Hubert [DE/DE]; Staufenstrasse 1, D-6233 Kelkheim (DE).</p>		<p>(74) Gemeinsamer Vertreter: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT; Zentrale Patentabteilung, Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BB, BE (europäisches Patent), BF (OAPI Patent), BG, BJ (OAPI Patent), BR, CA, CF (OAPI Patent), CG (OAPI Patent), CH (europäisches Patent), CM (OAPI Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GA (OAPI Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, KP, KR, LK, LU (europäisches Patent), MC, MG, ML (OAPI Patent), MR (OAPI Patent), MW, NL (europäisches Patent), NO, RO, SD, SE (europäisches Patent), SN (OAPI Patent), SU, TD (OAPI Patent), TG (OAPI Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: VIRUS/HERBICIDE RESISTANCE GENES PROCESS FOR PRODUCING SAME AND THEIR USE</p> <p>(54) Bezeichnung: VIRUS/HERBIZIDRESISTENZ-GENE, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Viral genes, for example "coat" protein genes, which reduce the corresponding virus infection symptoms or viral resistance, may be combined with herbicide resistance genes in order to transform plants. This combination makes it easier to select transgenic plants. In addition, in practical agricultural applications, plant vitality is increased thanks to viral tolerance and the herbicide resistance gene enables improved plant protection to be achieved.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Virusgene, z.B. "coat" Protein-Gene, die eine Reduzierung der entsprechenden Virus-Infektionssymptome oder Virusresistenz bewirken, können mit Herbizidresistenzgenen zur Transformation von Pflanzen kombiniert werden. Durch eine derartige Kombination wird die Selektion der transgenen Pflanzen erleichtert. Ausserdem wird im praktischen Feldanbau die Vitalität der Pflanzen durch die Virustoleranz gesteigert und durch das Herbizidresistenzgen ein verbesserter Pflanzenschutz möglich.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Sowjet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Beschreibung

Virus/Herbizidresistenz-Gene, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

Die Synthese von Virus "coat" Protein in Pflanzen führt zu einer verstärkten Resistenz der Pflanze gegenüber dem entsprechenden Virus. Die Europäische Patentanmeldung O 240 331, beispielsweise, beschreibt die Herstellung von Pflanzen-Zellen, die ein solches "coat" Protein enthalten.

Tumer et al. [EMBO J. 6, 1181 (1987)] haben die Transformation von Tabak- und Tomaten-Pflanzen mit einem chimären Gen, das für das "coat" Protein des Alfalfa Mosaic Virus kodiert, durchgeführt. Die Nachkommen dieser transformierten Pflanzen zeigten eine signifikante Reduzierung der entsprechenden Virus-Infektionssymptome, in einigen Fällen sogar Virus-Resistenz.

Es wurde nun gefunden, daß solche Virusgene mit einem Herbizidresistenzgen kombiniert werden können, was die Selektion der transgenen Pflanzen erleichtert. Gleichzeitig wird im praktischen Feldanbau die Vitalität der Pflanzen durch die Virustoleranz gesteigert und durch das Herbizidresistenzgen ein verbesserter Pflanzenschutz möglich. Es wurde allgemein beobachtet, daß die Herbizidapplikation einen stimulierenden Einfluß auf das Wachstum ausübt. Die erfindungsgemäß transformierte Pflanze zeigt diesen Effekt verstärkt, wodurch ein verbesserter Pflanzenertrag erreicht werden kann.

Herbizidresistenzgene sind bereits bekannt. In der Offenlegungsschrift DE 37 16 309 wird die Selektion nicht-pilzähnlicher Bakterien, die gegen Phosphinothricin resistent sind, beschrieben. Aus der DNA dieser Selektanten kann das Phosphinothricin-Resistenzgen auf ein 2 kb großes Fragment eingegrenzt werden.

In der Deutschen Offenlegungsschrift 37 37 918 ist ein Weg zur Synthese des Phosphinothricin-Resistenzgens aus dem Genom von *Streptomyces viridochromogenes* aufgezeigt. Ein Einbau in Genstrukturen, mit Hilfe derer transformierte Pflanzen gegen das Herbizid resistent werden, wird dort ebenfalls beschrieben.

Die Erfindung betrifft somit ein Gen kodierend für eine Virusresistenz kombiniert mit einer Herbizidresistenz.

Im folgenden wird die Erfindung detailliert beschrieben, insbesondere in ihren bevorzugten Ausführungsformen. Ferner wird die Erfindung durch den Inhalt der Ansprüche bestimmt.

Die Gene für die Virusresistenz, insbesondere die Virus "coat" Proteine, kann man ausgehend von isolierter Virus RNA durch cDNA-Klonierung in Wirtsorganismen erhalten. Bevorzugt wird dabei von der RNA des Cucumber Mosaic Virus, des Alfalfa Mosaic Virus oder des Brom Mosaic Virus ausgegangen.

Herbizidresistenzgene können aus Bakterien, z.B. der Gattungen *Streptomyces* oder *Alcaligenes*, isoliert werden. Bevorzugt wird mit dem Phosphinothricinresistenzgen aus *Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben, W. et al., Gene 80, 25-57 (1988)) gearbeitet, das für eine Expression in Pflanzen entsprechend modifiziert werden kann.

Die Gene werden jeweils mit Hilfe der Vektoren pUC19, pUC18 oder pBluescript (Stratagene, Heidelberg, Product Information) kloniert und sequenziert.

Das Gen wird in einen intermediären Vektor mit Pflanzenpromotor kloniert. Derartige Vektoren sind beispielsweise die Plasmide pPCV701 (Velt n J. et al. EMBO J. 3, 2723-2730 (1984)), pNCN (Fromm H. et al. PNAS 82, 5824-5826 (1985)), oder pNOS (an, G. et al., EMBO J. 4, 277-276 (1985)). Bevorzugt wird der Vektor pDH51 (Pietrzak,

M. et al., NAR 14, 5857, (1986)) mit einem 35S-Promotor, bzw. der Vektor pNCN mit einem Nos-Promotor verwendet.

- 5 Nach anschließender Transformation von E. coli, wie z.B. E. coli MC 1061, DH1, DK1, GM48 oder XL-1, werden positive Klone nach an sich bekannten Methoden (Maniatis et al., Lab. Manual), wie Plasmidminipräparation und Spaltung mit einem entsprechenden Restriktionsenzym, identifiziert.
- 10 Diese positiven Klone werden dann zusammen in einen binären Pflanzenvektor subkloniert. Als Pflanzenvektor können pGV3850 (Zambrysk, P. et al., EMBO J. 2, 2143-2150 (1983)) oder pOCA18 (Olszewski, N., NAR 16, 10765-10782, (1988)) eingesetzt werden. Vorteilhaft wird mit pOCA18 gearbeitet.
- 15 Die erhaltenen binären Pflanzenvektoren, die Pflanzenpromotoren mit dem angehängten DNA-Fragment für die Expression von Virus Coat Protein und Phosphinotricin Resistenz in der T-DNA enthalten, werden verwendet, um
- 20 Pflanzen zu transformieren. Dies kann durch Techniken wie Elektroporation oder Mikroinjektion erfolgen. Bevorzugt wird die Kokultivierung von Protoplasten oder die Transformation von Blattstückchen mit Agrobakterien angewandt. Dazu wird das Pflanzenvektorkonstrukt durch Transformation mit
- 25 gereinigter DNA oder, vermittelt über einen Helferstamm wie E. coli SM10 (Simon R. et al., Biotechnology 1, 784-791 (1983)) in Agrobacterium tumefaciens wie A282 mit einem Ti Plasmid über ein "triparental mating" transferiert. Direkte Transformation und triparental mating wurden, wie
- 30 in "Plant Molecular Biology Manual" (Kluwer Academic Publisher, Dordrecht (1988)) beschrieben, durchgeführt.
- 35 Es können grundsätzlich alle Pflanzen mit den die erfindungsgemäß konstruierte DNA tragenden binären Pflanzenvektoren transformiert werden. Bevorzugt sind dikotyledone Pflanzen, insbesondere Nutzpflanzen, die Stärke, Kohlenhydrate, Eiweiße oder Fette in nutzbaren

- Mengen in ihren Organen produzieren oder speichern oder die Obst und Gemüse produzieren oder die Gewürze, Fasern und technisch verwertbare Produkte oder Arzneimittel, Farbstoffe oder Wachse liefern und ebenfalls Futterpflanzen.
- 5 Als Beispiel sollen Tomate, Erdbeere, Avocado sowie Pflanzen, die tropische Früchte tragen, z.B. Papaya, Mango, aber auch Birne, Apfel, Nektarine, Aprikose oder Pfirsich genannt werden. Ferner sollen als zu transformierende Pflanzen beispielhaft alle Getreidearten, Raps, Rüben...
- 10 angeführt werden. Die transformierten Zellen werden mit Hilfe eines Selektionsmediums selektiert, zu einem Kallus herangezüchtet und auf einem entsprechenden Medium zur Pflanze regeneriert (Shain M. et al., Theor. appl. Genet. 72, 770-770 (1986); Masson, J. et al., Plant Science 53,
- 15 167-176 (1987), Zhan X. et al., Plant Mol. Biol. 11, 551-559 (1988); McGranham G. et al., Bio/Technology 6, 800-804 (1988); Novak F. J. et al., Bio/Technology 7, 154-159 (1989).
- 20 Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung.

Beispiele

25 1. Isolierung des Virus coat Protein Gens

- Die Reinigung des Virus erfolgte nach einer modifizierten Methode von Lot, M. et al. Annual Phytopath. 4, 25-32 (1972). Luzerne wurden mit Alfalfa Mosaic Virus infiziert und nach
- 30 14 Tagen im gleichen Volumen 0,5 M Na-Citrat (pH 6,5)/ 5 mM EDTA/0,5 % Thioglykolsäure aufgeschlossen. Dann gab man 1 Volumen Chloroform hinzu und zentrifugierte 10 Min mit 12000 x g. Der Überstand wurde mit 10 % PEG 6000 (w/w) versetzt und über Nacht vorsichtig gerührt. Danach wurde
- 35 10 Min mit 12000 x g abzentrifugiert und in 50 ml 5 mM Na-Borat, 0,5 mM EDTA (pH 9) resuspendiert. Nach Zugabe von Triton-X-100 (2 % Endkonzentrationen) wurde 30 Min gerührt

und mit 19000 x g 15 Min abzentrifugi rt. Das Virussediment wurde nach Zentrifugation mit 105000 x g 2 Std. in 5 mM Borat Puffer/0,5 mM EDTA (pH 9,0) aufgenommen und einer Saccharosezentrifugation (5-25 %) unterworfen.

5

Einzelne Fraktionen des Gradienten wurden auf einem Agarosegel analysiert, um den virushaltigen Bereich zu ermitteln. Die Virus RNA wurde durch Phenol/SDS Extraktion (Peden, K.W. et al., Virology 53, 487-492 (1973) von coat" Protein gereinigt. Die Auftrennung der RNA-Komponenten erfolgte mit Hilfe von 2,8 % Polyacrylamid mit 40 mM Tris-acetatpuffer (pH 7,5) wie in Synous, R.H., Aust. J. Biol. Sci 31, 25-37 (1978) beschrieben. Die RNA wurde elektrophoretisch in Dialyseschläuchen aus dem Gel entfernt und gefällt.

15

cDNA Transkripte von RNA3 bzw. RNA4 wurden, wie in Langenreis, K. et al. Plant Mol. Biol. 6, 281-288 (1986) beschrieben, mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotidprimern mit 3'-komplementären Nukleotiden zum Template, die am 5'-Ende jeweils eine SmaI bzw. PstI Schnittstelle besaßen, hergestellt.

20

Die Reaktionen zur cDNA Synthese erfolgten nach den "Current Protocols in Mol. Biol." ed. Ausubel, F. et al., John Wiley and Sons.

25

Die cDNA wurde in den SmaI/PstI geschnittenen pUC 19 Vektor kloniert. Die Insertion konnte mit SmaI/HindIII wieder entfernt werden.

30

Die vorgehend beschriebene Methode kann ebenso für die Isolierung des CMV "coat" protein Gens angewendet werden.

2. Isolierung des Herbizidresistenz Gens

Es wurde ein Phosphinothricinresistenzgen mit folgender Sequenz nach der Phosphoamidit-Methode in einem Synthesizer synthetisiert.

			9			18			27			36			45
5'	GTC	GAC	ATG	TCT	CCG	GAG	AGG	AGA	CCA	GTT	GAG	ATT	AGG	CCA	GCT
3'		G	TAC	AGA	GGC	CTC	TCC	TCT	GGT	CAA	CTC	TAA	TCC	GGT	CGA
			54			63			72			81			90
	ACA	GCA	GCT	GAT	ATG	GCC	GCG	GTT	TGT	GAT	ATC	GTT	AAC	CAT	TAC
10	TGT	CGT	CGA	CTA	TAC	CGG	CGC	CAA	ACA	CTA	TAG	CAA	TTG	GTA	ATG
			99			108			117			126			135
	ATT	GAG	ACG	TCT	ACA	GTC	AAC	TTT	AGG	ACA	GAG	CCA	CAA	ACA	CCA
	TAA	CTC	TGC	AGA	TGT	CAC	TTG	AAA	TCC	TGT	CTC	GGT	GTT	TGT	GGT
			144			153			162			171			180
	CAA	GAG	TGG	ATT	GAT	CTA	GAG	AGG	TTG	CAA	GAT	AGA	TAC	CCT	
	GTT	CTC	ACC	TAA	CTA	GAT	CTC	TCC	AAC	GTT	CTA	TCT	ATG	GGA	
			189			198			207			216			225
15	TGG	TTG	GTT	GCT	GAG	GTT	GAG	GGT	GTT	GTC	GCT	GGT	ATT	GCT	TAC
	ACC	AAC	CAA	CGA	CTC	CAA	CTC	CCA	CAA	CAC	CGA	CCA	TAA	CGA	ATG
			234			243			252			261			270
	GCT	GGG	CCC	TGG	AAG	GCT	AGG	AAC	GCT	TAC	GAT	TGG	ACA	GTT	GAG
	CGA	CCC	GGG	ACC	TTC	CGA	TCC	TTG	CGA	ATG	CTA	ACC	TGT	CAA	CTC
			279			288			297			306			315
	AGT	ACT	GTT	TAC	GTC	TCA	CAT	AGG	CAT	CAA	AGG	TTG	GGC	CTA	GGA
20	TCA	TGA	CAA	ATG	CAC	AGT	GTA	TCC	GTA	GTT	TCC	AAC	CCG	GAT	CCT
			324			333			342			351			360
	TCC	ACA	TTG	TAC	ACA	CAT	TTG	CTT	AAG	TCT	ATG	GAG	GCG	CAA	GGT
	AGG	TGT	AAC	ATG	TGT	GTA	AAC	GAA	TTC	AGA	TAC	CTC	CGC	GTT	CCA
			369			378			387			396			405
	TTT	AAG	TCT	GTC	GTT	GCT	GTT	ATA	GGC	CTT	CCA	AAC	GAT	CCA	TCT
	AAA	TTC	AGA	CAC	CAA	CGA	CAA	TAT	CCG	GAA	GGT	TTG	CTA	GGT	AGA
			414			423			432			441			450
25	GTT	AGG	TTG	CAT	GAG	GCT	TTG	GGA	TAC	ACA	GCC	CGG	GGT	ACA	TTG
	CAA	TCC	AAC	GTA	CTC	CGA	AAC	CCT	ATG	TGT	CGG	GCC	CCA	TGT	AAC
			459			468			477			486			495
	CGC	GCA	GCT	GGA	TAC	AAG	CAT	GGT	GGA	TGG	CAT	GAT	GTT	GGT	TTT
	GCG	CGT	CGA	CCT	ATG	TTC	GTA	CCA	CCT	ACC	GTA	CTA	CAA	CCA	AAA
			504			513			522			531			540
	TGG	CAA	AGG	GAT	TTT	GAG	TTG	CCA	GCT	CCT	CCA	AGG	CCA	GTT	AGG
30	ACC	GTT	TCC	CTA	AAA	CTC	AAC	GGT	CGA	GGA	GGT	TCC	GGT	CAA	TCC
			549			558									
	CCA	GTT	ACC	CAG	ATC	TGA	G		3'						
	GGT	CAA	TGG	GTC	TAG	ACT	CAG	CTG	5'						

Es handelt sich hierbei um eine Modifikation der von Wohlleben in Gene 70, 25-37 (1988) veröffentlichten Sequenz für das Ac tyltransferasegen.

Es ist ebenfalls möglich, eine genomische DNA-Bank aus dem von Wohlleb n b nutzten *Streptomyces viridochromogenes* in EMBL3 in *E. coli* auf Acetylierung von Phosphinothricin zu untersuchen. Das acetylierte Produkt kann sehr leicht
5 dünnsschichtchromatographisch aufgetrennt werden.

Das Gen wurde in pUC19 kloniert und sequenziert. Die Expression in Pflanzen erfolgte als Sali-Fragment.

10 3. Fusion Herbizidresistenzgen mit Nos Promotor

Der Vektor pNCN wurde Bam/SalI verdaut und das entstehende 2,5 bp Stück isoliert. Die überstehenden Enden wurden mit Mung bean Nuclease abverdaut. Das Acetyltransferase Gen
15 wurde als 0,5 bp Stück nach SalI Verdau isoliert und mit Klenow aufgefüllt. Nach Ligase konnten positive Klone durch Plasmidminipräparationen isoliert werden. Die Orientierung ergab sich aus einem SalI/Bam Verdau.

20 4. Fusion "coat" Protein Gen mit 35S Promotor

Ein 0,5 Basenpaare langes Fragment aus pAI RNA3 (dem pUC19 Vektor mit "coat" Protein Gen Insert) wurde nach SmaI/Hind III Verdau isoliert. Die überstehenden Enden wurden durch
25 Mung bean Nuclease abverdaut. Der Vektor pDH 51 wurde mit XbaI geschnitten und die Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Fragment und Vektor wurden ligiert und in MC 1061 transformiert (p35/AI). Dieselbe Konstruktion wurde mit PCM RNA3 für das "coat" Protein von CMV geschaffen
30 (p35/CM).

5. Fusion von 35S/"coat" Protein Gen und nos/Acetyltransferase Gen

35 Ein 1,3 kb Stück aus dem 35S/"coat" Protein Konstrukt (p35/AI, p35/CM) wurde nach EcoRI Verdau aus einem "low

melt" Agarose Gel isoliert. Der Pflanzenvektor pOCA 18 wurde EcoRI verdaut und mit dem 1,3 kbp DNA Stück ligiert. Dieser pOCA/35 RNA3 Vektor wurde mit Klenow aufgefüllt. Ein 2,5 kbp Hind III Stück aus nos/AC wurde nach Klenow
5 Behandlung der Enden in die aufgefüllte ClaI Stelle eingesetzt.

Konstruktionen: pOCA/AcAI3
pOCA/AcCM3

10

6. Transformation von Agrobakterien

Der Agrobakterienstamm pMP90RK wurde mit pOCA/AcAI3 bzw. pOCA/AcCM3 im triparental mating mit SM10 transformiert. Je
15 100 µl Bakterien aus Übernachtskulturen von SM10, die die Konstruktion tragenden MC 1061 und der Agrobakterien wurden abzentrifugiert und zusammen in 30 µl LB Medium suspendiert. Diese Zellen gab man auf ein kleines Rundfilter auf einer LB-Platte ohne Antibiotikum. Nach 12
20 Std. Inkubation bei 37°C wurde der Filter in 2,5 ml 10 mM MgCl₂ gewaschen und Aliquots davon auf LB-Platten mit Rifampicin, Tetrazyklin und Kanamycin selektiert. Positive Kolonien wurden durch Hybridisierung mit ³²P markierter DNA der Gene identifiziert.

25

7. Transformation von Luzerne

Zur Transformation der Luzerne wurde eine modifizierte Version der Kokultivierungsmethode nach Marton S. et al.,
30 Nature 277, 129-130 (1979) eingesetzt. Etwa 1 cm lange Stengelabschnitte von sterilen Pflanzen wurden in Erlenmeyerkolben in 40 ml steriles MS Medium gegeben und 11 ml einer verdünnten Übernachtskultur der Agrobakterien (5×10^7 Zellen/ml) zugegeben. Die Inkubation wurde 3 Tage
35 bei 25°C fortgesetzt. Die Stengelsegmente wusch man anschließend dreimal mit sterilem Wasser und brachte sie

auf MS-Medium mit 300 mg/l Carbamicillin und 100 mg/l Kanamycin. Nach 3 Wochen bildete sich ein Kallus, aus dem ganze Pflanzen regeneriert werden konnten.

5 8. Test der Pflanzen

Die Pflanzen zeigten nach Aufarbeitung von RNA und Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA der Gene Expression von AC-Gen mit Alfalfa Mosaic Virus "coat" Protein Gen.

10

Die Pflanzen wuchsen auf phosphinothricinhaltigem Medium und zeigten deutliche Toleranz nach Infektion mit Alfalfa Mosaic Virus.

Patentansprüche

1. Gen kodierend für eine Virusresistenz kombiniert mit einer Herbizidresistenz.
- 5 2. Gen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es für ein Virus "coat" Protein kodiert.
- 10 3. Gen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der für die Virusresistenz verantwortliche Teil des Gens durch cDNA Klonierung ausgehend von der RNA des Cucumber Mosaic Virus, des Alfalfa Mosaic Virus oder des Brom Mosaic Virus erhältlich ist.
- 15 4. Gen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es für die Phosphinothricinresistenz kodiert.
- 20 5. Gen nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß Phosphinothricinresistenzgen aus ... verwendet wird.
6. Wirtszelle enthaltend ein Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
- 25 7. Pflanzen, Pflanzenzellen sowie Teile oder Samen der Pflanzen enthaltend das Gen nach einem der Ansprüche 1 bis 5.